

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 7/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/18927 (43) Date de publication internationale: 22 avril 1999 (22.04.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02163</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 octobre 1998 (06.10.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/13011 14 octobre 1997 (14.10.97) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SEDERMA S.A. [FR/FR]; 29, rue du Chemin Vert, Boîte postale 33, F-78610 Le Perray en Yvelines (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LINTNER, Karl [FR/FR]; 15, avenue du Parc, F-78120 Rambouillet (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: COMPOSITIONS FOR COSMETIC AND DERMOPHARMACEUTICAL USE CONTAINING A PLANT EXTRACT OBTAINED FROM CLOVER (<i>TRIFOLIUM SP.</i>)</p> <p>(54) Titre: COMPOSITIONS A USAGE COSMETIQUE OU DERMOPHARMACEUTIQUE CONTENANT UN EXTRAIT VÉGÉTAL OBTENU A PARTIR DU TREFLE (<i>TRIFOLIUM SP.</i>)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns compositions for cosmetic and dermopharmaceutical use containing, in sufficient amount, a plant extract obtained from clover (<i>Trifolium sp.</i>), more particularly selected among the <i>Trifolium subterraneum L.</i>, <i>Trifolium repens L.</i>, <i>Trifolium pratense L.</i> varieties. With the molecules of plant origin thus obtained, the extract can imitate the effects of some steroid hormones. The cosmetic or dermopharmaceutical compositions containing said plant extract are advantageously used for all postmenopausal conditions where it is necessary to improve hydration, skin tonus and to obtain a skin smoothing effect.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des compositions à usage cosmétique ou dermopharmaceutique qui contiennent, en quantité suffisante, un extrait végétal obtenu à partir du trèfle (<i>Trifolium sp.</i>), choisi plus particulièrement parmi les variétés <i>Trifolium subterraneum L.</i>, <i>Trifolium repens L.</i>, <i>Trifolium pratense L.</i>. Grâce aux molécules d'origine végétale ainsi obtenues, l'extrait est capable de mimer les effets de certaines hormones stéroïdes. Les compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques contenant l'extrait végétal précédemment décrit faisant l'objet de ce brevet, sont avantageusement utilisées dans tous les états de post-ménopause où il est nécessaire d'améliorer l'hydratation, le tonus cutané et d'obtenir un effet de lissage de la peau.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Titre: Compositions à usage cosmétique ou dermatopharmaceutique contenant un extrait végétal obtenu à partir du trèfle (*Trifolium sp.*).

La ménopause est une étape physiologique naturelle qui correspond, aux alentours de la cinquantaine, à une chute des sécrétions hormonales responsables de la fécondité (œstrogènes et progestérone) et donc à une baisse importante de leurs concentrations tant sanguines que tissulaires.

Les très nombreuses conséquences négatives de ce phénomène sur l'organisme humain peuvent être améliorées par des traitements médicaux qui consistent à administrer, par voie générale, des hormones exogènes qui corrigent ce déséquilibre hormonal induit.

Des approches cosmétiques et dermatopharmaceutiques peuvent également améliorer le confort personnel et la beauté des femmes ménopausées. En effet, certaines conséquences de la ménopause, visibles de manière évidente, concernent le vieillissement cutané comme, par exemple, le dessèchement de la peau, l'apparition ou l'aggravation de rides dues à une diminution du tonus cutané ainsi qu'à la diminution de l'épaisseur cutanée.

L'invention faisant l'objet de ce présent brevet, réside dans la découverte qu'un extrait végétal obtenu à partir du trèfle (*Trifolium sp.*), choisi plus particulièrement parmi les variétés *Trifolium subterraneum L.*, *Trifolium repens L.*, *Trifolium pratense L.*, quand il est correctement réalisé, est capable de corriger tous ces défauts qui perturbent la vie normale des femmes ménopausées. Le précédent extrait végétal de trèfle (*Trifolium subterraneum L.*, *Trifolium repens L.*, *Trifolium pratense L.*) est obtenu à partir de la plante entière ou, de préférence, à partir des parties aériennes fleuries et séchées, par extraction éthanolique dans un rapport de 15 grammes de plantes pour 85 grammes de solvant. Après séchage, l'extrait sec est repris dans du butylène glycol.

L'analyse par chromatographie en phase liquide réalisée sous haute pression (HPLC) de l'extrait végétal ainsi obtenu, révèle la présence de molécules de la famille des isoflavones telles que la génistéine, la daidzéine, la biochanine A, la pratenséine et le coumestérol.

La présente invention démontre que ces molécules, lorsqu'elles sont correctement extraites par l'homme de l'art comme décrit ci-dessus, sont de véritables phyto-œstrogènes, qui, lorsqu'elles sont appliquées par voie topique, sont capables de mimer

localement les effets bénéfiques des œstrogènes, d'origine humaine ou animale ou de synthèse, administrés par voie systémique.

L'exemple d'obtention de l'extrait végétal obtenu à partir du trèfle (*Trifolium subterraneum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L) précédemment décrit
5 faisant l'objet de ce présent brevet, n'est pas limitatif. Il est en effet possible de réaliser l'extrait de trèfle par d'autres procédés comme, par exemple, la simple décoction, la lixiviation, l'extraction sous reflux, l'extraction au moyen d'ultrasons ou de micro-ondes ou enfin des techniques à contre courant, sans que cette liste soit limitative.

Par ailleurs, les solvants d'extraction cités ci-dessus ne sont pas limitatifs et peuvent être
10 choisis parmi l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, la glycérine, le polyéthylène glycol, les éthers méthyliques ou éthyliques des diglycols, les polyols cycliques, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les alcools (méthanol, éthanol, propanol, butanol), ou tout mélange de ces solvants.

Par souci de clarté dans ce document, parmi les différents effets bénéfiques qui ont été
15 trouvés au cours du développement de l'extrait de trèfle (*Trifolium subterraneum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L) précédemment décrit faisant l'objet de ce présent brevet, seulement trois exemples démontreront trois effets spécifiques et spécialement utiles dans les cas de post-ménopause, au moyen d'une expérience *in vitro* et deux études *in vivo* réalisées chez des volontaires.

20 Exemple 1

Durant 24 heures, des fibroblastes humains provenant de la même culture cellulaire, sont mis en présence de milieu de culture standard supplémenté, ou non pour les contrôles, avec l'extrait de trèfle précédemment décrit à une concentration soit de 0,3
25 %, soit de 1%. La stimulation de la synthèse de protéines est évaluée par colorimétrie (réaction dite du Biuret).

Pour standardiser les résultats, la quantité de protéines mesurée est exprimée pour
1000 cellules présentes dans le test. Par rapport aux expérimentations contrôles, en présence soit de 0,3 %, soit de 1 % d'extrait de trèfle, l'augmentation de la concentration de protéines est respectivement de $33,5 \pm 1,5$ % et $56,2 \pm 2,12$ %. Ainsi,
30 cet essai *in vitro* démontre le potentiel stimulant au niveau cutané de l'extrait de trèfle précédemment décrit, effet directement lié à un raffermissement et à un épaissement des peaux trop fines.

Exemple 2

Cet exemple démontre l'effet hydratant cutané obtenu, *in vivo*, sur les jambes de 13 volontaires adultes de sexe féminin. Le pouvoir hydratant de l'extrait de trèfle précédemment décrit, incorporé à 5% dans un gel classiquement utilisé en cosmétique, a été comparé à celui d'un placebo (le même gel mais sans extrait de trèfle) et à une absence de traitement.

Ce test peut être brièvement décrit comme suit. Le niveau d'hydratation de la peau est mesuré par la capacité électrique cutanée au moyen d'un cornéomètre (Courage et Khazaka, modèle CM 820), technique classiquement utilisée en cosmétologie. En effet, les propriétés électriques des couches superficielles de la peau sont fortement liées à sa teneur en eau.

Trois sites indépendants sont repérés à l'aide d'adhésifs et de marquages au stylo puis, après une période de 20 minutes de repos en position assise, les mesures correspondant au T0 sont réalisées en triplicate, sur chaque site. Chacun des deux gels étudiés (placebo et extrait de trèfle) est alors appliqué jusqu'à complète pénétration, sur un site indépendant, à raison de 20 µl par site. Le troisième site précédemment repéré ne reçoit aucun produit. Les volontaires restent au repos. Trois mesures par site sont effectuées toutes les heures, et cela, pendant 7 heures.

La température et l'hygrométrie de la pièce où le test est réalisé sont maintenues constantes tout au long du test.

Le tableau suivant montre les variations, en pourcentage par rapport à T0, des mesures réalisées pendant 7 heures. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes calculées à partir des 3 mesures réalisées.

	T 0	T +1H	T +2H	T +3H	T +4H	T +5H	T +6H	T +7H
Rien	0	-0,3	-2,0	+0,5	+0,5	+0,1	+0,9	-0,9
Placebo	0	+0,5	0,0	+2,8	+1,9	+4,0	+1,1	+0,2
Extrait	0	+25,8	+21,2	+25,3	+22,8	+25,7	+21,7	+22,0

Le gel contenant l'extrait de trèfle précédemment décrit démontre clairement un fort pouvoir hydratant puisque non seulement l'hydratation cutanée est augmentée de 22% à 25% par rapport au début de l'essai mais, de plus, elle est parfaitement constante et cela durant au moins les 7 heures que dure le test.

Dans les mêmes conditions, le gel placebo (sans l'extrait de trèfle), ne présente aucun effet hydratant, tout comme il est possible de le constater lorsque aucun produit n'est appliqué.

Exemple N°3

5 Cet exemple rapporte l'effet anti-rides obtenu, *in vivo*, sur un panel constitué de 13 volontaires adultes de sexe féminin. Le pouvoir antirides de l'extrait de précédemment décrit, incorporé à 5% dans une crème classiquement utilisée en cosmétique, est comparé à celui d'un placebo (la même crème mais sans extrait de trèfle). Les crèmes sont appliquées sur des sites précisément identifiés, situés sur le coin de l'oeil droit ou
10 gauche, selon une répartition randomisée, deux fois par jour, pendant 28 jours.

Le paramètre pris en compte est le relief cutané, au niveau du contour de l'oeil (rides dites de la patte d'oie). Les quantifications des différentes variables du relief sont réalisées par analyse vidéo-informatique d'empreintes au silicone prises à la surface de la peau selon les protocoles décrits par Corcuff et al. (1985, *Int. J. Cosm. Sci.* 7:117-126) et Corcuff et al. (1995, in *Handbook of non-invasive methods and the skin*, Serup & Jemec eds., CRC Press:89-96). Le tableau ci-dessous indique la différence, en
15 pourcentage, des valeurs moyennes obtenues entre T +28 jours et T0 pour les profondeurs moyennes de la ride principale (colonne A) ou pour l'ensemble des plis (colonne B), pour la densité des plis principaux (colonne C) ainsi que pour la mesure de la rugosité (colonne D). La présence d'une étoile à côté de la valeur indique une
20 différence statistiquement significative entre les mesures à T+28 et à T0 (test t de Student, $p < 0,01$).

	A	B	C	D
Placebo	0,2	+ 0,5	- 1,1	+ 3,8
25 Extrait	- 18,2 *	- 21,1 *	- 36,9 *	- 19,9 *

La crème contenant l'extrait de trèfle précédemment décrit démontre clairement un puissant effet anti-rides puisque l'on observe une différence statistiquement significative entre le début et la fin de l'étude *in vivo* et ceci, sur l'ensemble des quatre paramètres classiquement utilisés dans cette indication.

30 Il est à noter que dans les mêmes conditions expérimentales, la même crème ne présente absolument aucun effet si l'extrait végétal obtenu à partir du trèfle précédemment décrit n'a pas été incorporé, ce qui démontre bien que c'est seulement à

l'extrait précédemment décrit dans ce brevet que l'on peut attribuer l'effet bénéfique observé.

L'extrait végétal obtenu à partir du trèfle précédemment décrit peut être utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette liste soit limitative.

Il est possible d'incorporer l'extrait végétal obtenu à partir de trèfle (*Trifolium subterraneum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L) précédemment décrit, dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, de les absorber sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

L'extrait végétal obtenu à partir de trèfle (*Trifolium subterraneum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L) précédemment décrit peut être combiné dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins.

L'extrait végétal obtenu à partir du trèfle précédemment décrit est utilisé soit sous forme liquide, soit sous forme sèche obtenue par les techniques classiques de précipitation, de séchage, d'évaporation, d'atomisation ou de lyophilisation

Les concentrations de l'extrait végétal obtenu à partir de trèfle (*Trifolium subterraneum* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L) précédemment décrit peuvent varier entre 0,01% et 50% (p/p), préférentiellement entre 0.5 % et 5 % en poids, dans le produit fini.

L'extrait végétal obtenu à partir du trèfle est avantageusement utilisé dans les applications cosmétiques ou dermopharmaceutiques qui corrigent et/ou réparent au niveau cutané, les effets du vieillissement, des dérèglements hormonaux ou de la ménopause.

Ces compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques sont utilisées pour la préparation de médicaments pour tous les soins de la peau, particulièrement les effets du vieillissement, des dérèglements hormonaux ou de la ménopause.

6

REVENDECATIONS

1. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles contiennent un extrait de trèfle (*Trifolium sp.*).
2. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon la revendication 1, caractérisées en ce que le trèfle utilisé peut être choisi plus particulièrement parmi les variétés *Trifolium subterraneum L.*, *Trifolium repens L.*, *Trifolium pratense L.*.
3. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 1 à 2, caractérisées en ce que l'extrait de trèfle est obtenu à partir de la plante entière ou, de préférence à partir de la partie aérienne fleurie et sèche.
4. Procédé d'obtention des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon les revendications 1 à 3 caractérisées en ce que les solvants d'extraction utilisés sont choisis parmi l'eau, le propylène glycol, le butylène glycol, la glycérine, le polyéthylène glycol, les éthers méthyliques ou éthyliques des diglycols, les polyols cycliques, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les alcools (méthanol, éthanol, propanol, butanol), ou tout mélange de ces solvants.
5. Procédé d'obtention selon la revendication 4 caractérisé en ce que l'extrait de trèfle est obtenu par extraction éthanolique puis, qu'après séchage, l'extrait sec est repris dans du butylène glycol.
6. Procédé d'obtention des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisées en ce que l'extraction réalisée à partir de trèfle peut être remplacée par des techniques de macération ou par d'autres procédés comme, par exemple, la simple décoction, la lixiviation, l'extraction sous reflux, l'extraction au moyen d'ultrasons ou de micro-ondes ou enfin des techniques à contre courant.
7. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisées en ce que l'extrait de trèfle est utilisé soit sous forme liquide, soit sous forme sèche obtenue par les techniques classiques de précipitation, de séchage, d'évaporation, d'atomisation ou de lyophilisation.
8. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 7 caractérisées en ce que la concentration de l'extrait de trèfle est comprise entre 0,01% et 50% (p/p), préférentiellement entre 0.5 % et 5 % en poids, dans le produit fini.

9. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, 7 ou 8 caractérisées en ce que l'extrait de trèfle peut être utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles.
10. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 7 à 9 caractérisées en ce que l'extrait de trèfle est incorporé dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, ou absorbés sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.
11. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 7 à 10 caractérisées en ce que l'extrait de trèfle est combiné dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, extraits marins.
12. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou 7 à 11, dans les applications cosmétiques qui corrigent et/ou réparent au niveau cutané, les effets du vieillissement, des dérèglements hormonaux ou de la ménopause.
13. Compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques selon 12 utilisées pour la préparation de médicaments pour tous les soins de la peau, particulièrement les effets du vieillissement, des dérèglements hormonaux ou de la ménopause.